

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS BIOLOGIA CELULAR**

NATHÁLIA NOGUEIRA DA COSTA

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
BOVINOS: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Belém
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NATHÁLIA NOGUEIRA DA COSTA

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
BOVINOS: AVALIAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociência e Biologia Celular.
Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

**Belém
2010**

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Costa, Nathália Nogueira da

Efeito da triiodotironina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos: avaliação do desenvolvimento, morfologia e expressão gênica de embriões bovinos / Nathália Nogueira da Costa; orientador, Otávio Mitio Ohashi. – 2010.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

1. Bovino – Reprodução. 2. Bovino – Embrião. 3. Fertilização *in vitro*. 4. Hormônios tireoidianos. 5. Expressão gênica. I. Título.

CDD – 20. ed. 636.20824

NATHÁLIA NOGUEIRA DA COSTA

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
BOVINOS: AVALIAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação submetida à aprovação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, no curso de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular – Área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, a comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi (**Orientador**)
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Paulo Roberto Adona
Universidade Norte do Paraná- UNOPAR

Prof^a. Dr^a. Simone do Socorro
Damasceno Santos
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Suplente)

Belém, 04 de março de 2010

Dedico

*Aos meus pais **Raimundo Nonato** e **Maria de Fátima**,
inspirações da minha vida,
pela eterna paciência, carinho e amor dispensados a mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida.

Aos meus pais Raimundo Nonato e Maria de Fátima, e irmãos Nayara e Nonato, pela constante preocupação com meu trabalho e comigo e pelo apoio em todos os momentos dessa minha jornada.

Ao meu namorado, Erick Almeida, por agüentar todos os meus estresses, e que por inúmeras vezes foi deixado de lado nesta jornada, e ainda assim, nunca deixou de me apoiar e me incentivar nos momentos de aflição.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Otávio Ohashi pela oportunidade, confiança e por todas as broncas (que não foram poucas!!) e conselhos, com certeza contribuíram com a minha formação científica e moral. Muito Obrigada!!

À Professora Dra. Simone Damasceno, pelos ensinamentos, confiança e, acima de tudo, amizade.

Ao Professor Dr. Moysés Miranda, pela orientação e discussões, sempre paciente e disposto a contribuir com o seu conhecimento para o êxito deste trabalho.

À amiga Marcela Cordeiro, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na minha vida científica e por nunca ter se negado a ajudar nos momentos que precisei.

À Priscila Di Paula, por toda ajuda que me deu durante a execução dos experimentos.

Ao professor Dr. Paulo Adona, pela colaboração nos experimentos envolvendo biologia molecular, seus ensinamentos foram fundamentais na realização deste projeto.

Ao Dr. Marcos Chiaratti, obrigada pelas orientações nas análises de expressão gênica.

Aos amigos, Carla Carvalho, Thiago Velasco, Rafael Vilar e Camila Pará, minha gratidão pela amizade sincera e duradoura.

Aos amigos do Laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA, Priscila, André (“Mohamed”), Ellen, Kayan, Nilda, Davi e Renato que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Fazenda Experimental da UNOPAR; pela coleta dos embriões *in vivo*, e ao farmacêutico Samuel Gueira pela colaboração na execução desta etapa do experimento.

Ao Laboratório de Polimorfismo do DNA, na pessoa do Dr. Artur Luiz da Silva, e do mestrando Sávio.

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica, na pessoa da Dra Andréa Kely Campos, e da mestranda Dayse Alencar, pela colaboração na execução dos experimentos de expressão gênica.

À Universidade Federal do Pará e o Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Matadouro Frigorífico do Tapanã e a SOCIPE, pela doação do material biológico, indispensável para realização deste trabalho, e aos seus funcionários pelo auxílio técnico.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HIPÓTESE.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivo Geral.....	4
1.2.2. Objetivos Específicos.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	5
2.1.1. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	6
2.1.2. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	8
2.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	9
2.2. TRIIODOTIRONINA.....	10
2.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA.....	14
2.3.1. Funções dos genes avaliados neste estudo.....	15
2.3.1.1. Gene <i>Octamer-binding transcription factor-4</i> (OCT 4) ou POU5F1.....	15
2.3.1.2. Gene <i>Conexina 43</i> (COX 43).....	16
2.3.1.3. Gene <i>Glicoproteína transportador de glicose isoforma 1</i> (GLUT1).....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> DE EMBRIÕES.....	19
3.2. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	19
3.2.1. Coleta de ovários e punção folicular.....	19
3.2.2. Seleção dos complexos <i>cumulus</i>-oócitos (CCOs).....	20

3.2.3. Maturação <i>in vitro</i>	21
3.2.4. Fecundação <i>in vitro</i>	23
3.2.5. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões	24
3.3. ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	24
3.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA.....	25
3.4.1 Extração de RNA Total dos Embriões Produzidos <i>In Vitro</i>	25
3.4.2 Obtenção de Cdna	26
3.4.3 Amplificação do cDNA dos genes de interesse	26
3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.5.1 Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de T3 durante Maturação <i>in vitro</i>	28
3.5.2 Experimento 2: Maturação <i>in vitro</i> de oócitos sem e com a melhor concentração de T3	29
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS	30
4.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE T3 DURANTE MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
4.2 EXPERIMENTO 2: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA....	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural dos hormônios tireoidianos.....	11
Figura 2:	Modelo esquemático ilustrando a formação do canal intercelular. O conexon, formado pelo grupo de 6 conexinas e a conexina individual.....	17
Figura 3:	Oócitos selecionados para a MIV.....	21
Figura 4:	Placa de 4 poços utilizada para MIV.....	22
Figura 5:	Placa usada para MIV com óleo.....	23
Figura 6:	Esquema representativo do experimento 2. No qual ,D são dias referentes ao momento do desenvolvimento embrionário, e Ctrl é o Controle (0 nM de T3).....	30
Figura 7:	Concentração relativa dos transcritos do gene OCT 4 (média ± erro padrão) dos embriões produzidos In Vivo, In Vitro (sem T3) e In Vitro com 50 nM de T3 ($p= 0,12$).....	34
Figura 8:	Concentração relativa dos transcritos do gene GLUT 1 (média ± erro padrão) dos embriões produzidos In Vivo, In Vitro (sem T3) e In Vitro com 50 nM de T3 ($p= 0,59$).....	35
Figura 7:	Concentração relativa dos transcritos do gene COX 43 (média ± erro padrão) dos embriões produzidos In Vivo, In Vitro (sem T3) e In Vitro com 50 nM de T3 ($p= 0,065$).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento (pares de base) e seu respectivo código de acesso no GenBank.....	27
Tabela 2: Taxa de desenvolvimento embrionário com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação <i>in vitro</i>	31
Tabela 3: Cinética do desenvolvimento dos embriões tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação <i>in vitro</i>	32
Tabela 4: Classificação morfológica dos embriões tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação <i>in vitro</i>	33
Tabela 5: Número Total de células dos blastocistos expandidos e eclodidos tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação <i>in vitro</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
Na ⁺ .	Cátion Sódio
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BMP-6	Proteína Morfogenética Óssea 6
CCO	Complexo- <i>cumulus</i> -oócito
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
DEPC	Dietileno pyrocarbonato
CO ₂	Gás Carbônico
et al.	<i>et alli</i> (e colaboradores)
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>g</i>	Gravidade
GLUT 1	Glicoproteína transportador de glicose 1
HDL	Proteína de alta densidade
HEPES	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid</i>

IGF-1	Fator de crescimento ligado a insulina
LH	Hormônio Luteinizante
MCT 4	<i>Monocarboxylate transporter 4</i>
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mL	mililitro
mm	milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
N ₂	Gás Nitrogênio
nM	Nano molar
O ₂	Oxigênio
p	Probabilidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
PFKP	<i>Platelet-type phosphofructokinase</i>
p85 α	Subunidade reguladora da fosfatidilinositol3 kinase
PI3K	Fosfatidilinositol 3,4,5trifosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embrião
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	<i>Sintetic Oviduct Fluid</i> (Fluido do Oviduto Sintético)
TCM	<i>Tissue Culture Medium</i> (Meio de Cultura de Tecidos)

TL	TALP (Tyrodes com Albumina, Lactato e Piruvato)
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
O ₂	Oxigênio

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do hormônio Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e sua ação sobre o subsequente desenvolvimento, morfologia e expressão gênica em embriões bovinos. Inicialmente, para determinar a melhor concentração de T3 a ser usada na MIV (Experimento 1) oócitos foram selecionados e distribuídos aleatoriamente entre o Grupo Controle (0 nM de T3) e os seguintes grupos experimentais com diferentes concentrações de T3 (5, 25, 50 e 100 nM) na MIV, sendo posteriormente fecundados e cultivados *in vitro*, e analisados quanto ao desenvolvimento embrionário. Não houve diferença estatística quanto às taxas de clivagem e número total de blastômeros entre os tratamentos. Em relação à taxa de blastocisto, os Grupos com 25, 50 e 100 nM de T3 foram semelhantes ao Controle ($38,3 \pm 7,3$), diferente da concentração de 5 nM, que reduziu a taxa de blastocisto ($27,4 \pm 6,3$; $p < 0,05$). Quanto a cinética do desenvolvimento, verificou-se que os Grupos de 50 e 100 nM de T3 aumentaram as taxas de embriões eclodidos no 8º dia de cultivo com relação ao controle ($62,4 \pm 11,7$; $53,1 \pm 16,3$ vs $32,4 \pm 5,3$; respectivamente; $p < 0,05$). Vale ressaltar que na classificação morfológica apenas os embriões do Grupo de 50 nM apresentaram mais embriões Grau 1, semelhante ao Controle. No experimento 2, embriões no 8º dia de cultivo produzidos *in vivo* e *in vitro* provenientes de oócitos maturados sem e com 50 nM de T3 (melhor concentração determinada no experimento 1) foram analisados quanto a expressão dos genes OCT-4, GLUT 1 e COX 43. Não foi observada diferença entre os grupos de embriões para nenhum dos transcritos avaliados ($p > 0,05$). Sendo assim, nossos resultados mostram que a suplementação do meio de MIV com 50 nM de T3 estimulou a cinética do desenvolvimento, entretanto essa influencia parece não estar relacionada a expressão dos genes OCT 4, GLUT 1 e COX 43.

Palavras-Chaves: triiodotironina, oócito, fecundação *in vitro* expressão gênica embrionária.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the use of the hormone triiodothyronine (T3) in vitro maturation (IVM) of oocytes and its action on the subsequent development, morphology and gene expression in bovine embryos. Initially, to determine the best concentration of T3 to be used in IVM (Experiment 1) oocytes were selected and randomly distributed between the control group (0 nM T3) and the following experimental groups with different concentrations of T3 (5, 25, 50 and 100 nM) in the IVM, and then fertilized and cultured *in vitro* and analyzed for embryonic development. There was no statistical difference in the rates of cleavage and the total number of blastomeres between treatments. Regarding the rate of blastocyst groups with 25, 50 and 100 nM of T3 were similar to control (38.3 ± 7.3), differently was observed at concentration of 5 nM, which reduced the rate of blastocyst (27.4 ± 6.3 , $p < 0.05$). About the kinetics of development, it was found that the Group of 50 and 100 nM T3 increased rates of embryos hatched on the 8th day of culture when compared with the control (62.4 ± 11.7 , 53.1 ± 16.3 vs 32.4 ± 5.3 , respectively, $p < 0.05$). It is important to mention about morphological classification, that only embryos of the Group of 50 nM had more Grade 1 embryos, similar to control. In the experiment 2, embryos at 8th day of culture, produced *in vivo* and *in vitro* from oocytes with and without 50 nM T3 (better concentration determined in experiment 1), were analysed for the gene expression of OCT-4, GLUT-1 and COX 43. There was no difference between the groups of embryos for any of the transcripts evaluated ($p > 0.05$). Therefore, our results shows that supplementation of IVM medium with 50 nM of T3 stimulated the kinetics of development, however, this influence is not related to gene expression of OCT 4, GLUT-1 and COX 43.

Key Words: triiodothyronine, oocyte, *in vitro* fertilization, embryo gene expression.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE), que consiste na maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento até o estágio de blastocisto, é uma ferramenta muito importante nos estudos sobre os mecanismos iniciais de desenvolvimento embrionário. Atualmente, além de servir de suporte para outras biotecnologias, a PIVE vem sendo amplamente empregada na produção de animais de interesse zootécnico (GONÇALVES et al., 2002).

Avanços tecnológicos que culminaram com o aperfeiçoamento da técnica de *Ovum Pick-Up* (OPU) contribuíram, significativamente, para a difusão da PIVE a nível comercial, tornando-a competitiva com relação à transferência de embrião oriundos da técnica de múltipla ovulação (LEEW et al., 2006). Outro fator que contribuiu para sua propagação foi a constante melhoria na quantidade e qualidade dos embriões produzidos, bem como, o conseqüente aumento das taxas de prenhez (DONG et al., 2001).

Apesar dos resultados satisfatórios envolvendo a PIVE, as taxas de blastocisto ainda estão aquém do que esta biotecnologia pode ofertar. Essa limitação pode estar relacionada a inúmeros fatores intrínsecos ao oócito e extrínsecos em relação à constituição dos meios (tampões, aminoácidos, substratos energéticos, íons, etc.) e condições de cultivo como atmosfera gasosa (RIEGER, 1992), importantes por estarem envolvidos na ativação de fatores transcricionais, que regulam o metabolismo e a expressão de genes (HARVEY, 2007).

As condições atuais de cultivo refletem em um embrião de qualidade inferior, caracterizados por alta incidência de mixoploidia quando comparados com os produzidos *in vivo* (72 vs. 26%, respectivamente), cavitação precoce sem compactação adequada, proteínas de comunicação intercelular reduzidas, ciclos celulares atrasados resultando em desenvolvimento retardado e menor número de células. Além disso, os blastômeros costumam ser mais escuros do que dos embriões produzidos *in vivo* (THOMSON, 1997 ; ENRIGHT et al., 2000; LONERGAN et al., 2003).

Melhorias nas condições de cultivo e constituição dos meios têm permitido o desenvolvimento até o estágio de blastocisto de uma porcentagem razoável dos oócitos fecundados, porém a maioria desses zigotos bloqueia após as primeiras clivagens, o que segundo MEIRELLES et al., (2004) está relacionado, principalmente, com a qualidade do citoplasma oocitário.

Objetivando melhorar a competência oocitária inúmeros trabalhos têm demonstrado a importância da suplementação dos meios de maturação *in vitro*, com a adição de substâncias como fatores de crescimento epidérmico e insulínico (GULER et al., 2000); β -mercaptoetanol, cisteína e cistina que estimulam a síntese da glutatona, um importante antioxidante celular (MATOS & FURNUS, 2000) e antioxidantes como catalase e superóxido dismutase (ALI et al., 2003).

O hormônio triiodotironina (T3) possui ampla ação em todas as células, apresentando receptores tanto no citoplasma quanto na região promotora de importantes genes, relacionados ao metabolismo celular (MOELLER et al., 2005). SPICER et al., em 2001, demonstraram que o hormônio T3 possui efeito direto a nível de células da teca e granulosa de oócitos bovinos estimulando a esteroidogênese, e

ainda que o mesmo possui receptores em oócitos e células da granulosa em várias espécies (WAKIM et al., 1987, 1993; BISWAS et al., 1993; SECHMAN et al., 2009), sugerindo que o T3 exerce influencia na maturação oocitária.

Sendo assim, torna-se relevante analisar o efeito do hormônio triiodotironina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e o subsequente desenvolvimento embrionário, tendo como ferramenta a avaliação da qualidade embrionária, através de análises morfológicas e análise da expressão de genes, que atuam como marcadores de qualidade no embrião (GLUT 1, COX 43 e OCT 4) .

1.1 HIPÓTESE

A adição do hormônio triiodotironina no meio de maturação *in vitro* pode melhorar o metabolismo oocitário, e assim promover um aumento no potencial de desenvolvimento embrionário subsequente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ação do hormônio Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor concentração de T3 (5, 25, 50 e 100 nM) na maturação *in vitro* através da análise da taxas de desenvolvimento embrionário: clivagem, formação de blastocisto, cinética do desenvolvimento, classificação morfológica e contagem do número total de células (Experimento 1);

- Investigar a expressão dos genes COX 43, OCT 4 e GLUT 1 dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* sem e com T3 (melhor concentração de T3 obtida no Experimento 1) durante a maturação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A PIVE, inicialmente, era vista como uma biotécnica restrita às entidades de pesquisa, sendo algo fora da realidade do setor pecuário (VIANA, 2007). Atualmente, é uma ferramenta amplamente requisitada pelo setor comercial, sendo indispensável nos programas de melhoramento genético, evitando, por exemplo, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas com infertilidade adquirida (CAMARGO et al., 2006; LONERGAN, 2008).

Em 2007 o Brasil consolidou uma liderança absoluta no mercado mundial ao comunicar um número expressivo (212.441) de embriões produzidos por fecundação *in vitro*, representando 86,6% do total mundial (VIANA, 2009).

Apesar dos avanços nas técnicas envolvidas na PIVE apenas 40% dos oócitos submetidos ao processo de fecundação atinge o estágio de blastocisto, entretanto nem todos estes apresentam a capacidade de chegar a termo (LONERGAN, 2003). A qualidade inferior dos embriões produzidos *in vitro*, na maioria das vezes, está relacionada com a composição dos meios e condições de cultivo, demonstrando a necessidade de pesquisas que proponham modificações nos protocolos, visando diminuir as diferenças entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (KHURANA & NIEMANN, 2000).

2.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Para que oócito seja fecundado e desenvolva até o estágio de blastocisto, é necessário que o mesmo passe por transformações nucleares e citoplasmáticas (HYTTEL et al., 1997).

A maturação nuclear, que compreende a progressão do estágio de diplóteno da prófase I até a fase de metáfase II, requer um período de 18 a 24 horas, sendo marcado pela extrusão do 1º corpúsculo polar e formação da placa metafásica (GONÇALVES et al., 2002). *In vivo* a maturação nuclear é acionada após o pico pré-ovulatório de LH sendo regulada por mudanças no padrão de fosforilação de várias proteínas celulares. Sob condições *in vitro* esse processo pode ser acionado espontaneamente, após a retirada do *complexo cumulus* oócito (CCO) do microambiente do folículo, onde encontra-se sob ação de fatores inibitórios pouco conhecidos. (HYTEL et al., 1989).

Na maturação citoplasmática ocorrem mudanças no formato e localização das organelas assim como a ativação de vias metabólicas específicas. A distribuição citoplasmática das mitocôndrias é alterada, e ao final da maturação há o deslocamento das mesmas para o centro do oócito (FAIR et al., 1997). FLEMING e SAACKE (1972) sugerem que o oócito ao iniciar a maturação nuclear utiliza os estoques de lipídios, por observarem uma associação do retículo endoplasmático, mitocôndrias e gotas lipídicas.

Como a maturação nuclear pode ser controlada de maneira muito mais simples que a maturação citoplasmática, muitos laboratórios tem se empenhado em melhorar o potencial de desenvolvimento bloqueando o reinício da meiose, e assim permitindo mais tempo para o oócito completar a sua maturação citoplasmática.

Hashimoto et al. (2002) inibiram a maturação nuclear de oócitos bovinos utilizando um potente e específico inibidor de cinase dependente de ciclina, a butirólactona I, e verificaram uma melhora na produção de embriões, entretanto, a maioria dos laboratórios que usaram essa metodologia, não obtiveram os mesmos resultados. LONERGAN et al (1997) ao analisarem a produção *in vitro* de embriões, oriundos de oócitos tratados com inibidores de meiose, verificaram que não houve uma melhora na qualidade embrionária, mas que o sucesso desse tipo de metodologia seria útil no estudo sobre a aquisição da competência oocitária.

As células da granulosa desempenham um papel chave na aquisição da competência do oócito, em função da transferência de nutrientes e fatores essenciais, como metabólitos, aminoácidos, transporte de AMPc e purinas, via junções de comunicação (KIDDER & MHAWI, 2002, SUTTON et al., 2003, GILCHRIST, 2008).

Entretanto vem sendo bastante discutido as funções regulatórias que o oócito desempenha sobre as células da granulosa, caracterizando uma comunicação bidirecional. Entre os fatores secretados pelo o oócito destacam-se a Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e a 6 (BMP-6), membros da família dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β). Foi comprovado que esses fatores foram capazes de proteger as células do *cumulus* da apoptose induzida pela estaurosporina (um potente agente apoptótico), por promover um gradiente de fatores anti-apoptóticos (HUSSEIN et al., 2005).

HUSSEIN et al. (2006) mostraram que esses fatores secretados pelo o oócito têm efeito na produção *in vitro* de embriões, pois ao maturarem CCO com oócitos desnudos em meio livre de soro, obtiveram taxas de blastocistos (51%) significativamente maiores que os de controle (39%). Sendo que os resultados foram

ainda melhores quando a maturação foi realizada apenas com GDF-9 (58%), BMP-15 (50%) ou com a adição de ambos os fatores (55%) quando comparado ao controle (41%).

Os conhecimentos sobre a competência do oócito têm aumentado gradativamente, assim a sua aplicação na melhoria da maturação *in vitro* contribuindo para o aumento da eficiência da PIVE.

2.1.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

A fecundação tem início quando o espermatozóide se liga a receptores espermáticos espécie-específicos, presentes na zona pelúcida do oócito. O oócito sofre ativação após a fusão do espermatozóide à membrana plasmática respondendo, principalmente, com uma rápida despolarização da membrana, seguido pela exocitose dos grânulos corticais, e com a retomada da meiose até a extrusão do segundo corpúsculo polar (GONÇALVES et al., 2002).

Para adquirir a capacidade de fecundar o oócito, o espermatozóide passa por várias modificações seqüenciais, ainda não completamente conhecidas, que incluem a capacitação e a reação acrossômica (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A constituição dos meios de fecundação tenta mimetizar o que ocorre no trato genital feminino. Nesse sentido o meio mais utilizado pela maioria dos laboratórios, o TALP (Meio de Tyrodes com Albumina, Lactato e Piruvato), é suplementado por heparina, uma glicosaminoglicana importante na capacitação *in vivo* e por uma mistura de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE). A penicilamina aumenta a percentagem

de espermatozoides que sofrem reação acrossômica, quando usada na presença de epinefrina. A hipotaurina aumenta a motilidade espermática e a penetração no oócito (GORDON, 1994; MILLER et al., 1994)

Sabe-se que níveis fisiológicos de espécies reativas do oxigênio (EROS) são importantes para a hiperativação, capacitação e reação acrossômica no espermatozoide (HENKEL, 2005). Quando esses níveis estão aumentados, principalmente devido a um desequilíbrio entre os agentes pro e antioxidantes, as ERO causam danos ao DNA, proteínas e peroxidação lipídica, comprometendo a capacidade do espermatozoide fecundar o oócitos (GONÇALVES et al., 2008).

Nesse sentido, com intuito de favorecer a reação acrossômica e a capacitação espermática, pesquisadores têm relatado os efeitos da L-arginina, um aminoácido que desempenha uma importante função na motilidade espermática *in vitro* em coelhos, bovinos e cabras (RADANY & ARTHETON, 1981, O'FLAHERTY et al., 2004; SRIVASTAVA et al., 2006).

2.1.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

O CIV dos embriões é uma das etapas mais importantes do processo de PIVE e tem como objetivo garantir as condições adequadas para o desenvolvimento eficaz dos zigotos até o estágio de blastocisto. Atualmente, o meio mais utilizado para o cultivo dos embriões é o fluido do oviduto sintético (SOF) desenvolvido por TERVIT et al. em 1972.

Em função da grande importância da composição dos meios de cultivo, pesquisadores vêm desenvolvendo meios com uma variedade de suplementações, como antioxidantes, fatores de crescimento e macromoléculas, tentando mimetizar ao máximo as condições de desenvolvimento *in vivo* (LIM et al., 2007).

Sendo assim, BLOCK (2007) comprovou a importância do fator de crescimento ligado a insulina 1 (IGF-1), na PIVE com melhora significativa na taxa de gestação, podendo sua ação pode estar ligada a produção de RNAm importante durante o desenvolvimento embrionário, como a Na/K ATPase e a desmocolina II.

Quanto à atmosfera gasosa, sabe-se que a concentração de oxigênio no lúmen do trato genital feminino (3 a 9%) é inferior a concentração encontrada nas condições *in vitro* (20%) utilizada pela maioria dos laboratórios (FISCHER & BAVISTER, 1993). Como o cultivo sob altas concentrações de O₂ pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e, assim, comprometer o desenvolvimento embrionário, vários pesquisadores testaram o efeito da redução dos níveis de O₂ e obtiveram resultados satisfatórios principalmente com relação a qualidade embrionária. (TAKAHASHI et al., 2002; CORREA et al., 2007).

2.2 TRIIODOTIRONINA (T3)

Os dois principais hormônios tireoidianos são o tiroxina (T4) e o triiodotironina (T3). O T4, principal hormônio secretado pela tireóide, é o precursor da forma ativa, o T3. Essa conversão pode acontecer na membrana plasmática ou no

retículo endoplasmático pela enzima iodotironina deiodinase, caracterizada pela retirada de um resíduo de iodo (Figura 3) (KANEKO, 1989; GEREBEN et al., 2008).

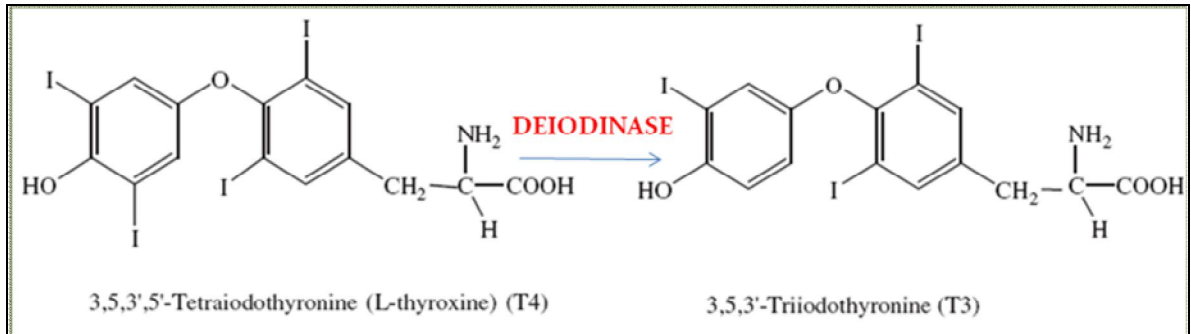


Figura 1: Fórmula estrutural dos hormônios tireoidianos

O T3, composto biologicamente ativo (KANEKO, 1989), quando em baixa concentração, atua no metabolismo dos carboidratos potencializando a ação da insulina sobre a síntese de glicogênio, porém quando em concentrações elevadas estimula a glicogenólise (GRIFFIN & OJEDA, 1996).

O T3 possui ampla ação celular, possuindo receptores no citoplasma e na região promotora de genes alvo (DAVIS et al., 2008). A interação T3 e receptores nucleares, forma um complexo receptor-hormônio/DNA, que ao ser ativado estimula ou inibe a transcrição gênica, interferindo na produção de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) que intermedia a síntese de proteínas (SPINOSA et al., 2002; GUYTON & HALL, 2006).

A interação T3 e receptores no citosol recruta proteínas ligadas à expressão gênica em células alvo, como, por exemplo, a ligação do T3 ao receptor TRbeta no citosol ativa p85 α (subunidade reguladora da fosfatidilinositol 3-kinase) e gera a ativação da fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI3K) e dá início a uma cascata de reações

que culminam na expressão de genes importantes no metabolismo celular da glicose, como o GLUT 1 (Glicoproteína transportador de glicose 1) relacionado a captação de glicose; o PFKP (*Platelet-type phosphofructokinase*), envolvido na glicólise, e o MCT 4 (*Monocarboxylate transporter 4*) responsável pela exportação de lactato (MOELLER et al., 2006).

SAELIM et al. (2007) usaram células do fígado com intensa atividade apoptótica induzida para avaliar a influência dos hormônios tireoidianos sobre mitocôndrias. Para isso extratos de oócitos de *Xenopus*, tratados com T3, foram injetados nas células do fígado. Os resultados mostram que os hormônios tireoidianos possuem ação a nível de receptores na membrana de mitocôndrias e que esses podem inibir a atividade apoptótica via liberação do citocromo C.

Com relação à fisiologia reprodutiva, mulheres com disfunção na tireóide apresentam problemas no ciclo menstrual e conseqüentes problemas de fertilidade influenciando, portanto, diretamente a atividade cíclica dos ovários (KANEKO, 1989, GRIFFIN & OJEDA, 1996, MCDONALD, 1980; POPPE et al., 2007). Na fisiologia reprodutiva masculina, os níveis normais de hormônios tireóides são importantes na maturação da *rete testis* durante a vida pré-natal, pós-natal e pré-puberdade. Estudos demonstram que o T3 tem ação nas células de Sertoli, agindo na diferenciação e desenvolvimento da rede testicular, e ainda contribuindo no aporte energético dessas células (CHOKSI et al., 2003).

Receptores de T3 foram identificados nas células do *cumulus* e em oócitos de suínos, camundongos e humanos (WAKIM et al., 1987; BISWAS et al., 1993; ZHANG et al., 1997). Em camundongos, o T3 demonstrou possuir ligações específicas de alta afinidade no núcleo de células da granulosa *in vitro*, aumentando a síntese

protéica, formação de pregnenolona e progesterona a partir do colesterol e liberação de progesterona (BISWAS et al, 1993).

O cultivo de folículos pré-antrais tratados com T3 (1, 10 e 100 nM) durante 6 dias, demonstrou que concentrações suprafisiológicas (100nM) afetam negativamente a formação do antro, via mecanismos envolvendo a habilidade das células da granulosa em responder ao FSH e ainda comprometendo a retomada da meiose dos oócitos (CECCONI et al., 2004).

Os trabalhos envolvendo a ação do T3 na maturação de CCO em bovinos são escassos, porém evidências comprovam a sua importância na fisiologia folicular ovariana. Em 2006, BLASZCZYK e colaboradores mensuraram as concentrações de T3 livre, T4 livre, colesterol e HDL (lipoproteínas de alta densidade) no fluido folicular. Não houve diferença entre as concentrações em relação ao tamanho do folículo, entretanto a concentração de T3 livre foi predominante entre os hormônios tireoidianos, talvez devido a uma alta taxa de conversão de T4 para T3 nos folículos.

SPICER et al. (2001) avaliaram os efeitos *in vitro* dos hormônios tireoidianos nas células da granulosa e da teca de folículos bovinos, e observaram que mesmo na concentração que mimetiza os níveis sistêmicos (5 nM), os folículos cultivados com de T3, FSH e insulina tiveram um efeito estimulatório pequeno na atividade da aromatase.

Tendo em vista que o T3 possui atividade regulatória em folículos ovarianos de diversas espécies, seja através da liberação de progesterona ou função metabólica basal. Torna-se relevante estudar os efeitos do T3 durante a maturação *in vitro* e subsequente desenvolvimento embrionário, visto que não há trabalhos que abordem este tema.

2.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA

A avaliação da qualidade do embrião produzido *in vitro* em relação ao *in vivo* por muito tempo foi preferencialmente realizada pela caracterização morfológica, por ser um método não invasivo, dessa forma preservando a integridade do embrião. Para a caracterização morfológica são considerados parâmetros como a cor e compactação dos blastômeros, cinética de desenvolvimento e o diâmetro do embrião (VAN SOOM et al., 2003).

Entretanto, hoje em dia, somente a análise da morfologia não é suficiente na avaliação qualitativa do embrião, por essa razão a avaliação da expressão gênica têm sido essencial no estudo da qualidade do embrião no estágio pré-implantação, devido a diferenças no padrão de expressão gênica em embriões *in vitro* e *in vivo* (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000).

O método mais utilizado para a quantificação dos transcritos é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), que tem sido bastante usada na quantificação relativa da expressão gênica (CAMARGO, 2006). Este método envolve a amplificação da seqüência alvo e da seqüência de um endógeno, cuja quantidade de transcrito não varia entre amostras. A histona H2a é considerada como o melhor gene endógeno para a análise da expressão gênica de embriões em estágio de pré-implantação, porque a sua expressão é constante durante o início do desenvolvimento (ROBERT, et al., 2002).

Diferenças metabólicas, qualitativas e quantitativas de expressão de vários genes têm sido observadas entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, (WRENZYCKI et al., 1998).

LONERGAN et al. (2003) observaram que a expressão de transcritos para o gene Bax (relacionado com a indução da apoptose) não haviam sido observados até o estágio de 16 células em embriões produzidos *in vivo*, diferente dos embriões produzidos *in vitro*, nos quais a expressão foi detectada a partir de 8 células, aumentando gradativamente ao longo do desenvolvimento.

São muitos os trabalhos que vem explorando a técnica do PCR em tempo real como uma ferramenta no reconhecimento de genes importantes durante estágio pré-implantação (LONERGAN et al., 2003; LEQUARRE et al., 1997; WRENZYCKI et al., 1999; BETTS et al., 1997). A caracterização do padrão de expressão de embriões *in vivo*, fornece informações que podem servir como parâmetro de qualidade embrionária, contribuindo assim para as análises dos embriões produzidos *in vitro* (WRENZYCKI, et al., 2007; BADR et al., 2007).

2.3.1 Função dos genes avaliados neste estudo

2.3.1.1 Gene *Octamer-binding transcription factor-4* (OCT 4) ou POU5F1

O gene OCT 4, pertencente a família dos fatores de transcrição POU, são expressos em linhagens de células germinativa e células tronco embrionárias. A função do gene OCT 4 têm sido relacionada à manutenção da totipotência das células embrionária. Essa família de fatores de transcrição regula a expressão de genes através da ligação ao DNA na seqüência de octâmero ATGCAAAT (PALMIER et al., 1994).

A expressão de RNA mensageiro e níveis de proteínas OCT 4 foram observados em oócitos e blastocistos até o décimo dia de cultivo, nas células trofoblásticas, e predominantemente na massa célula interna (MCI). Sua expressão persiste até a diferenciação em hipoblasto e epiblasto, demonstrando assim que a função desse gene não se restringe a condição de pluripotência celular (VAN EIJK et al., 1999; KIRCHHOF et al., 2000).

2.3.1.2 Gene Conexina 43 (COX 43)

Junções gap são canais intercelulares que facilitam a troca passiva de metabólitos, moléculas e íons menores de 1KD. A unidade fundamental das junções gap é o *conexon*, uma estrutura cilíndrica que forma um hemi canal na membrana citoplasmática, cada *conexon* é um hexâmero, formado por seis subunidades proteicas chamadas de conexinas (Figura 2) (KIDDER & MHAWI, 2002).

A conexina 43 (COX 43) é uma das subunidades das junções gap encontrada nas células da granulosa (JOHNSON et al., 2002), oócitos, mórula e blastocistos *in vivo*. Já os embriões bovinos produzidos *in vitro* não apresentaram expressão detectável de COX 43 quando avaliados no sétimo dia de cultivo (WRENZYCKI et al., 1996).

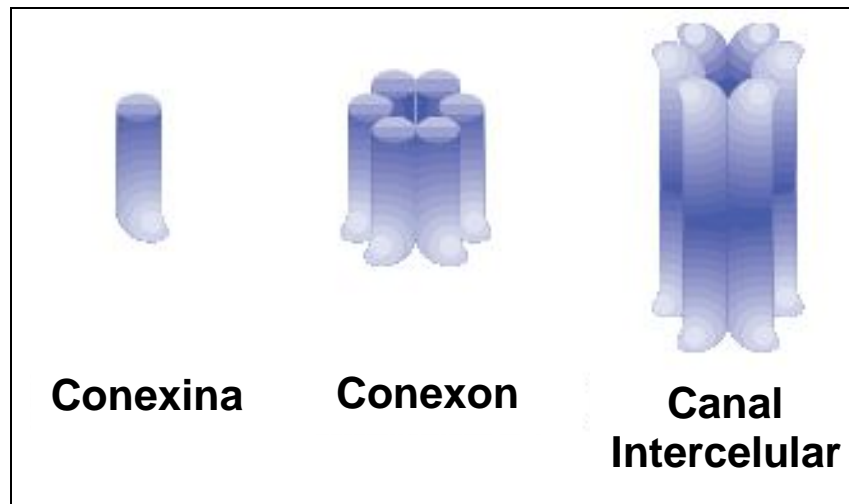


Figura 2: Modelo esquemático ilustrando a formação do canal intercelular. O conexon, formado pelo grupo de 6 conexinas e a conexina individual. Adaptado de Kidder & Mhawi, 2002.

Entretanto RIZOS et al. (2002) verificaram que a expressão de RNAm para a COX 43 em embriões produzidos *in vitro* estava diminuída, porém não ausente. Essa expressão reduzida estaria envolvida na compactação dos embriões, que *in vitro* acontece de forma inadequada, sendo bastante influenciada pelas condições de cultivo. (WRENZYCKI et al., 1999).

2.3.1.3 Gene Glicoproteína transportador de glucose isoforma 1 (GLUT 1)

GLUT 1 pertence a um grupo de transportadores glicoprotéico de glicose não dependente de Na⁺. A expressão de GLUT 1 durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional é restrito a membrana basolateral em células do trofoblasto de blasctocistos bovinos (LUISIER et al., 1998).

O período de compactação e cavitação é acompanhado por alterações na utilização de substratos energéticos, com a glicose substituindo o piruvato e o lactato como fonte de energia prioritária. Com a formação da blastocela o consumo de energia aumenta e a expressão dos transportadores de glicose também (WRENZYCKI et al., 2003).

Em embriões cultivados *in vitro* a expressão de transcritos é reduzida quando comparada com os embriões desenvolvidos *in vivo* (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; WRENZYCKI et al., 2001). O número expressivo de transportadores GLUT 1, talvez, seja em função da necessidade extra de glicose, estocado na forma de glicogênio , garantindo assim reserva energética para o início do desenvolvimento embrionário *in vivo* (THOMPSON et al., 1996).

Experimentos mostram que assim como a composição química do meio de cultivo, a atmosfera gasosa também exerce influencia na expressão gênica do GLUT 1. Uma vez que o cultivo *in vitro* de embriões sob baixa tensão de O₂ (2%) foi responsável pelo aumento na expressão do GLUT 1 quando comparado com os embriões produzidos sob altas tensões de O₂ (20%) (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; HARVEY et al., 2004;).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES

Novilhas entre o 10^o e 13^o dia após o cio foram superovuladas com 140-180 mg de Folltropin-V (Bioniche Animal Health Inc., Bogart, GA, USA), divididos em oito doses de concentração decrescente, as quais foram aplicadas duas vezes ao dia, durante quatro dias. Após a indução com prostaglandina, as novilhas foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado. Oito dias após a inseminação, os embriões foram recuperados por lavagem uterina com PBS. Os embriões em estágio de blastocisto expandido e eclodido foram congelados dois a dois em 1 µl de solução de PBS contendo 0,1% de álcool polivinílico (PVA) e 1UI/µL de inibidor de RNase (Invitrogen, EUA), como será descrito a seguir, e mantidos em N₂ líquido até o momento da extração de RNA. O procedimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental da UNOPAR (Universidade Norte do Paraná).

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

3.2.1 Coleta de ovários e punção folicular

Ovários bovinos foram obtidos do abatedouro frigorífico da SOCIPE (Sociedade Cooperativista dos Pecuaristas) e transportados em solução salina estéril (0,9 % de NaCl) à temperatura ambiente até o Laboratório de Fecundação *in Vitro* da UFPA em um período aproximado de 2 horas. No laboratório, os folículos ovarianos medindo entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados com o auxílio de uma agulha 40 x 12mm acoplada a uma seringa de 10 mL.

3.2.2 Seleção dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs)

Foram selecionados os oócitos bovinos que apresentavam *cumulus oophorus* compacto, com quatro ou mais camadas de células; ooplasma com granulações finas; aspecto homogêneo; coloração marrom e circunferência regular (Figura 3). Os CCOs selecionados foram lavados em meio 199 (tampão HEPES), suplementado com 22 µg /mL piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 50 µg/mL de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB).

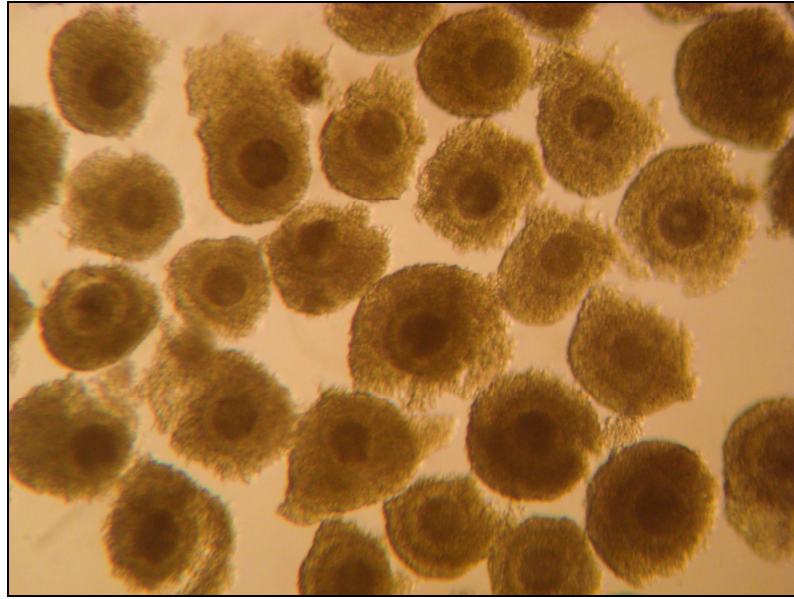


Figura 3: Oócitos selecionados para a MIV.

3.2.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs foram lavados e incubados em meio de MIV (TCM 199 suplementado com bicarbonato de sódio, 10% SFB (v/v), 0,5 µg/mL de FSH, 50 µg/mL de LH, piruvato e antibióticos) de acordo com o grupo experimental (0, 5, 25, 50 e 100 nM de T3). A MIV foi realizada em placas de 4 poços (400µL por poço) (Figura 4), sob atmosfera de 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, alta umidade e temperatura de 38,5 °C por um período de 18 horas.

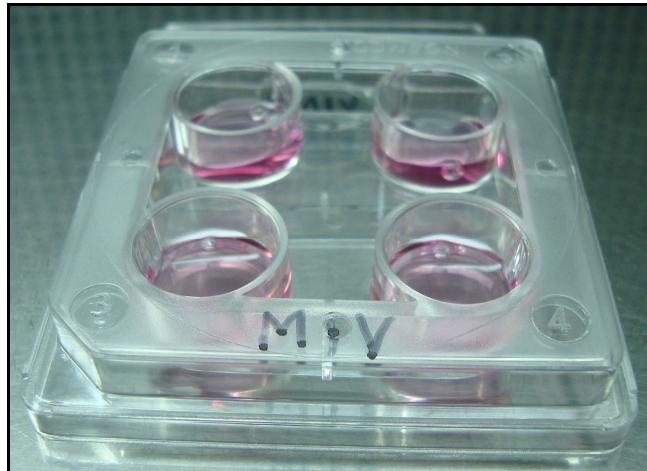


Figura 04: Placa de 4 poços utilizada para MIV.

A utilização desse sistema sem o uso de óleo mineral foi necessária, porque o hormônio T3 é lipossolúvel, evitando-se dessa forma sua migração ou incorporação pelo óleo mineral. Paralelamente foi feito um cultivo em outra placa sem o hormônio triiodotironina e com a utilização de óleo mineral sobre as microgotas (100 μ L) (figura 5), para a obtenção de monocamada de células da granulosa livre da influência do hormônio para ser utilizada no desenvolvimento embrionário.

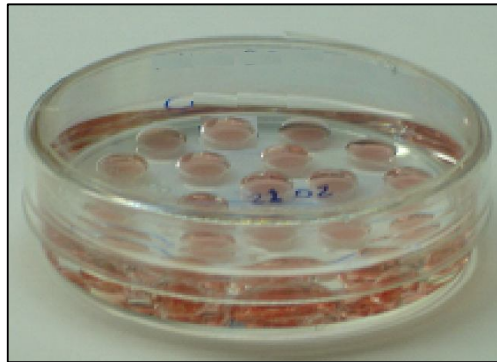


Figura 05: Placa usada para MIV com óleo

3.2.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para fecundação, o sêmen de um único touro foi descongelado a 38,5 °C por 30 segundos e depositado, cautelosamente, sobre um tubo contendo gradientes descontínuos de Percoll (45/90%). Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação durante 7 minutos a 200 g, para remoção do diluidor e separação dos espermatozóides vivos dos mortos.

Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante centrifugado novamente, para retirada dos resíduos de Percoll, durante 3 minutos, em 2 mL de meio de FIV (TALP segundo PARRISH et al., 1988). A concentração espermática foi ajustada para 10^6 espermatozóides/mL. Após 18 a 20 horas de MIV os CCOs e os espermatozóides foram unidos em gotas de 80 μ L de meio de FIV e mantidos sob as mesmas condições citadas para a MIV.

3.2.5 Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após 27 a 30 horas de incubação, os prováveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e espermatozoides aderidos à zona pelúcida. Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões bovinos com monocamada de células da granulosa (CG), não tratadas com o hormônio triiodotironina, mediante a substituição do meio de MIV por 100 µL do meio de cultivo embrionário SOF segundo Holm et al. (1999).

3.3 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A avaliação quantitativa do desenvolvimento embrionário foi realizada no segundo dia de cultivo, mediante a contagem das taxas de clivagem e no oitavo dia de cultivo, através da taxa de formação de blastocisto, e cinética do desenvolvimento, com base na classificação dos embriões em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, além disso, os embriões foram classificados morfológicamente em embriões Grau 1, 2 ou 3, de acordo com o *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS* (STRINGFELLOW & SEIDEL 1998). Todas as análises foram feitas em microscópio invertido.

A análise qualitativa foi realizada através da contagem do número total de células. Para isso os blastocistos expandidos e eclodidos foram fixados em formol

salino, no oitavo dia de desenvolvimento, para posterior marcação com fluorocromo Hoechst 33342 (10 µg/mL) e observação em microscópio de epifluorescência.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA

3.4.1 Extração de RNA Total dos Embriões Produzidos *In Vitro* e *In Vivo*.

No oitavo dia de cultivo os blastocistos expandidos e eclodidos foram armazenados em microtubos de centrifuga de 0,2mL, dois a dois ou cinco a cinco, em 1µL de solução de PBS contendo 0,1% de álcool polivinílico (PVA) e 1UI/µL de inibidor de RNase (Invitrogen, EUA). As amostras foram congeladas por imersão direta em nitrogênio líquido, e em seguida armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total.

O RNA foi extraído pelo método do Trizol® (Invitrogen, Brasil), utilizando o protocolo de extração adaptado de Meirelles et al. (comunicação pessoal). Foi adotado o uso de *pools* de 10 embriões para a extração, pois obtém-se maior quantidade de cDNA, sendo possível também unir embriões de duas replicas experimentais (5 embriões por repetição). Sendo assim, a cada amostra contendo cinco embriões foi adicionado um Mix de 100 µL Trizol®, 1 µL Acrilamida linear e 9 µL de água DEPC. Em seguida foi feita lavagem em etanol 75%, adição de 20 µL de clorofórmio e centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo o RNA total, de duas amostras (*pools* de 5 embriões) foram unidas formando *pool* de dez embriões, ao qual foi adicionado 140 µL de álcool

isopropílico, seguindo incubação a -20°C . No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C , lavadas em $100\ \mu\text{L}$ de etanol 75%, e centrifugadas novamente a 7.500g por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante, contendo o RNA total foi ressuspenso em $10\ \mu\text{L}$ de água DEPC e as amostras foram estocadas a -80°C até o momento da reação de transcrição reversa.

3.4.2 Obtenção de cDNA.

Imediatamente após a extração do RNA, as amostras foram transformadas por PCR transcrição reversa (rtPCR) , para obtenção do cDNA, utilizando o kit high capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystem). Cada reação continha $2\ \mu\text{L}$ de oligonucleotídeos randômicos 10X, $1\ \mu\text{L}$ de enzima transcriptase reversa, $2\ \mu\text{L}$ de reagente tampão 10X, $0,8\ \mu\text{L}$ de mix dNTP (100nM), $1\ \mu\text{L}$ de inibidor de RNase, $3,2\ \mu\text{L}$ de água livre de nuclease, e $10\ \mu\text{L}$ de amostra de RNA em volume final de $20\ \mu\text{L}$. Foram adotadas as seguintes condições de ciclagem em termociclador Eppendorf (Mastercycler Personal): 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, 85°C por 5 minutos e resfriamento a -4°C . Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

3.4.3 Amplificação do cDNA dos genes de interesse

As amostras de cDNA dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* dos grupos com $0\ \text{nM}$ (controle) e $50\ \text{nM}$ de T3 foram analisados utilizando um ensaio de

quantificação relativa por PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Em todas as reações de PCR foi utilizado o corante ROX como referência passiva e para detecção do DNA o corante SYBR Green (Power SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems).

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise da expressão dos genes “alvo” (GLUT 1, COX 43 e OCT-4) e controle endógeno (H2A) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento (pares de base) e seu respectivo código de acesso no GenBank.

Gene	Espécie	Seqüência	Tamanho (pb)	GenBank
Oct-4	Bovino	GGTGTTTCAGCCAAACGACTATC TCTCTGCCTTGCATATCTCCTG	143pb	NM174580.1
Glut1	Bovino	CTGCTCATTAAACCGCAACGA TGACCTTCTTCTCCCGCATC	133pb	M60448
Cox 43	Bovino	AGAAAGAGCAGTACCCAGGCA GCTGACTCAACCGCTGTCC	154pb	BC105464
H2A	Bovino	AAAGCGTATTACCCCTCGTCA GAATCCAGGCATCCTTTAGACAG	166	BC109743.1

As amplificações dos transcritos estudados foram previamente ajustadas quanto à concentração de *primers* e especificidade e eficiência de amplificação. As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 s e 61°C por 1 min. Após cada corrida de PCR, a análise da curva de desnaturação foi

realizada para cada amostra, para detectar dímeros de oligonucleotídeos e produtos inespecíficos. Foram utilizados 0,2 μ M de cada par de oligonucleotídeos iniciadores para o gene do H2A, GLUT 1, OCT-4 e COX 43. A confirmação dos fragmentos obtidos para cada oligonucleotídeo iniciador foi realizada por eletroforese em gel com 2% de agarose, corado com brometo de etídio.

A eficiência de amplificação de cada transcrito foi estimada em triplicata utilizando-se uma curva-padrão construída por diluição serial do cDNA (1:4, 1:8, 1:16, 1:32), sendo analisados através do *software* 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems.

Foram realizadas três réplicas experimentais, sendo que cada transcrito foi amplificado individualmente em triplicata utilizando-se o kit Power SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) num volume final de reação de 20 μ L. Para cada amostra, o cDNA foi diluído 1:8 vezes para ser utilizado nas reações. Todos transcritos de uma mesma amostra foram amplificados numa mesma reação de PCR.

A quantidade relativa em cada amostra de cada transcrito de interesse (OCT-4, COX 43 e GLUT 1) foi corrigida pela quantidade de controle endógeno (H2A) da mesma amostra utilizando-se o método da curva padrão conforme sugestão do fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de T3 durante *Maturação in vitro*.

Os oócitos selecionados foram distribuídos aleatoriamente entre o Grupo Controle (0 nM de T3) e os seguintes grupos experimentais com diferentes concentrações de T3 (SIGMA T6397) (5, 25, 50 e 100 nM) na MIV, sendo posteriormente fecundados e cultivados *in vitro* como descrito anteriormente. No segundo dia de cultivo foram avaliados com relação a taxa de clivagem e no oitavo dia cultivo quanto a taxa de blastocisto, cinética do desenvolvimento, classificação morfológica e contagem do número de células. Foram realizadas 4 repetições.

3.5.1 Experimento 2: Análise da expressão gênica em embriões provenientes de oócitos maturados *in vitro* sem e com T3.

Para a avaliação da expressão gênica foram realizadas mais 6 repetições, onde os oócitos selecionados foram distribuídos aleatoriamente entre dois grupos experimentais não tratados ou tratados com T3 na MIV de acordo com o resultado obtido no experimento 1, em seguida foram fecundados e cultivados *in vitro* como descrito anteriormente.

No oitavo dia de cultivo embriões grau I e II em estágio de blastocisto eclodido oriundo da MIV sem (controle) e com T3, foram congelados, de cinco em cinco, a -80°C para posterior análise molecular. Para a comparação do padrão de expressão dos genes escolhidos foram utilizados, também, embriões produzidos *in vivo* (método de obtenção já descrito anteriormente) como demonstrado na Figura 6.

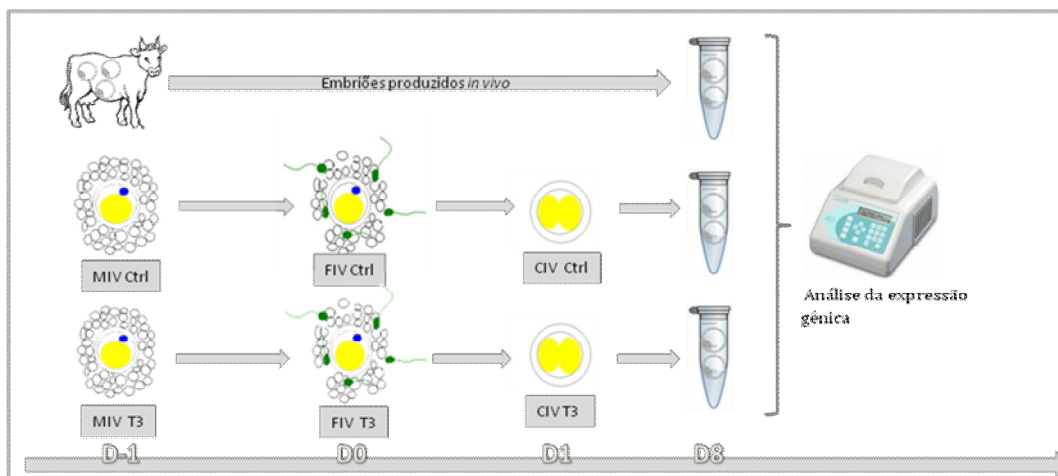


Figura 6: Esquema representativo do experimento 2. No qual ,D são dias referentes ao momento do desenvolvimento embrionário, e **Ctrl** é o Controle (0 nM de T3).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem, blastocisto, cinética do desenvolvimento embrionário, número total de células dos embriões, classificação morfológica e os resultados da expressão gênica relativa foram submetidos a ANOVA, com pós-teste Bonferroni quando solicitado, adotando-se o nível de significância de 5%, com auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE T3 DURANTE MATURAÇÃO *IN VITRO*.

Para avaliar o efeito do T3 durante a MIV sobre o subsequente desenvolvimento embrionário foram utilizados 737 oócitos, distribuídos em quatro

réplicas experimentais entre os Grupos: Controle (n= 145), 5 nM (n= 140), 25 nM (n= 147), 50 nM (n= 165) e 100 nM (n= 145).

Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre o Grupo Controle e os demais Grupos Experimentais e nem destes entre si com relação à taxa de clivagem. Em relação ao percentual de embriões produzidos no 8º dia cultivo, a suplementação com 5 nM de T3 reduziu significativamente ($p<0,05$) a taxa de blastocisto ($27,4 \pm 6,3$) em comparação ao Grupo Controle ($38,3 \pm 7,3$) assim como em relação ao Grupo com 50 nM ($41,8 \pm 9,7$) e 100 nM ($38,7 \pm 6,8$) de T3 como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2- Taxa de desenvolvimento embrionário com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro*.

Grupos	n	Clivagem %	Blastocisto %
		Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	145	$77,0 \pm 7,4$	$38,3 \pm 7,3^{a, c}$
5 nM	140	$72,2 \pm 5,7$	$27,4 \pm 6,3^b$
25 nM	147	$72,4 \pm 8,4$	$29,7 \pm 5,6^{b, c}$
50 nM	165	$75,2 \pm 6,5$	$41,8 \pm 9,7^a$
100 nM	145	$75,3 \pm 6,9$	$38,7 \pm 6,8^{a, c}$

n= número amostral; DP= desvio padrão;

^{a,b, c} Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ($p<0,05$).

Ao analisar a cinética do desenvolvimento intra grupo (Tabela 2) foi observada semelhança na proporção de BI (blastocisto inicial), BL (blastocisto), BX (blastocisto expandido) e BE (blastocisto eclodido) nos Grupos Controle, 5 nM e 100 nM de T3, na qual prevaleceram embriões expandidos e eclodidos. No grupo de 25 nM de T3 preponderou embriões no estágio de blastocisto expandido, enquanto que no grupo de 50 nM houve predomínio de embriões eclodidos ($p<0,05$).

A adição de 50 nM ($62,4 \pm 11,7$) e 100 nM ($53,1 \pm 16,3$) de T3 durante a MIV influenciou significativamente ($p < 0,05$) a taxa de embriões eclodidos no 8º dia de cultivo em relação ao Grupo Controle ($32,4 \pm 5,3$), 5 nM ($34,8 \pm 10,3$) e 25 nM ($34,1 \pm 7,0$). Não houve diferença ($p > 0,05$) com relação às taxas de BI, BL e BX como mostra a Tabela 3.

Tabela 3- Cinética do desenvolvimento dos embriões tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro*.

Grupos	n	BI %	BL %	BX %	BE %
		Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	55	$8,9 \pm 10,3^a$	$15,7 \pm 10,7^a$	$42,9 \pm 6,6^b$	$32,4 \pm 5,3^{b,A}$
5 nM	38	$7,5 \pm 9,6^a$	$15,1 \pm 15,4^b$	$42,6 \pm 13,5^b$	$34,8 \pm 10,3^{b,A}$
25 nM	44	$4,8 \pm 5,7^a$	$15,0 \pm 10,6^b$	$46,1 \pm 9,5^c$	$34,1 \pm 7,0^{d,A}$
50 nM	69	$4,4 \pm 6,3^a$	$7,4 \pm 2,7^a$	$25,8 \pm 11,2^b$	$62,4 \pm 11,7^{c,B}$
100 nM	56	$1,3 \pm 2,6^a$	$6,3 \pm 12,5^a$	$39,3 \pm 23,8^b$	$53,1 \pm 16,3^{b,B}$

Blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE);
n= número amostral; DP= desvio padrão;

^{a, b, c} Diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$);

^{A, B} Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Com relação à avaliação morfológica, quando as categorias foram analisadas intra grupo, pôde-se observar predomínio de embriões Grau 1 nos Grupos Controle (Grau 1: $51,2 \pm 11,7$ vs. Grau 2: $23,5 \pm 6,7$ e Grau 3: $25,3 \pm 14,3$; $p > 0,05$) e com 50 nM (Grau 1: $53,9 \pm 8,6$ vs. Grau 2: $34,8 \pm 4,8$ vs. Grau 3: $11,2 \pm 6,2$; $p > 0,05$) de T3. Já nos Grupos com 5 nM, 25 nM e 100 nM de T3, a distribuição de embriões Grau 1, Grau 2 e Grau 3 foi semelhante ($p > 0,05$). A análise entre os Grupos Experimentais revelou maior proporção de embriões Grau 1 ($p < 0,05$) nos Grupos Controle ($51,2 \pm 11,7$) e com 50 nM ($53,9 \pm 8,6$) de T3 em relação aos Grupos 5 nM ($39,8 \pm 2,6$), 25 ($33,9 \pm 5,9$) e 100 nM ($37,7 \pm 12,1$) de T3 (Tabela 4).

Tabela 4- Classificação morfológica dos embriões tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro*.

Grupos	n	GRAU 1 %	GRAU 2 %	GRAU 3 %
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle	55	51,2 ± 11,7 ^{a, A}	23,5 ± 6,7 ^b	25,3 ± 14,3 ^b
5 nM	38	39,8 ± 2,6 ^B	33,5 ± 11,4	31,3 ± 8,8
25 nM	44	33,9 ± 5,9 ^B	35,3 ± 21,7	30,8 ± 24,9
50 nM	69	53,9 ± 8,6 ^{a, A}	34,8 ± 4,8 ^b	11,2 ± 6,2 ^c
100 nM	56	37,7 ± 12,1 ^B	23,1 ± 5,0	39,2 ± 11,9

n= número amostral; DP= desvio padrão;

^{a, b, c} Diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente (p<0,05);

^{A, B} Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente (p<0,05).

Em relação a avaliação qualitativa não houve diferença estatística (p>0,05), entre os Grupos Controle, 5 nM, 25 nM, 50 nM e 100 nM de T3 com relação ao número total de células dos blastocistos expandidos (112,3 ± 30,1; 107,4 ± 30,8; 104,4 ± 26,4; 118,7 ± 26,4 e 113,8 ± 23,5, respectivamente) e blastocistos eclodidos (178,7 ± 37,3; 188,1 ± 48,2; 189,3 ± 40,8; 193,9 ± 32,8 e 207,9 ± 61,6, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5- Número Total de células dos blastocistos expandidos e eclodidos tratados com diferentes concentrações de Triiodotironina (T3) na maturação *in vitro*.

Grupos	BX		BE	
	n	Nº de células Média ± DP	n	Nº de células Média ± DP
Controle	17	112,3 ± 30,1	16	178,7 ± 37,3
5 nM	12	107,4 ± 30,8	11	188,1 ± 48,2
25 nM	10	104,4 ± 26,4	7	189,3 ± 40,8
50 nM	10	118,7 ± 26,4	17	193,9 ± 32,8
100 nM	11	113,8 ± 23,5	17	207,9 ± 61,6

n= número amostral; DP= desvio padrão; BX= Blastocisto expandido; BE= Blastocisto eclodido.

4.2 EXPERIMENTO 2: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA.

A análise da expressão dos genes OCT-4, GLUT 1 e COX 43 foi realizada em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* provenientes de oócitos maturados sem e com 50 nM de T3 (melhor concentração determinada no experimento 1). A expressão relativa destes genes foi individualmente avaliada em três repetições, utilizando-se conjuntos de 10 embriões por grupo e repetição, totalizando 90 blastocistos distribuídos da seguinte maneira: 30 no Grupo *In Vivo*, 30 *in vitro*, 30 *in vitro* com 50 nM de T3.

Não houve diferença na expressão relativa dos transcritos para os genes OCT 4 ($p= 0,12$) e GLUT 1 ($p= 0,59$) entre os embriões produzidos *in vivo* ($1,00 \pm 0,04$; $1,00 \pm 0,20$; respectivamente) comparado com os embriões *in vitro* ($1,80 \pm 0,17$; $1,36 \pm 0,42$; respectivamente) e embriões *in vitro* maturados com 50 nM de T3 ($1,76 \pm 0,12$; $1,36 \pm 0,28$; respectivamente) como ilustrado na Figura 7 e Figura 8.

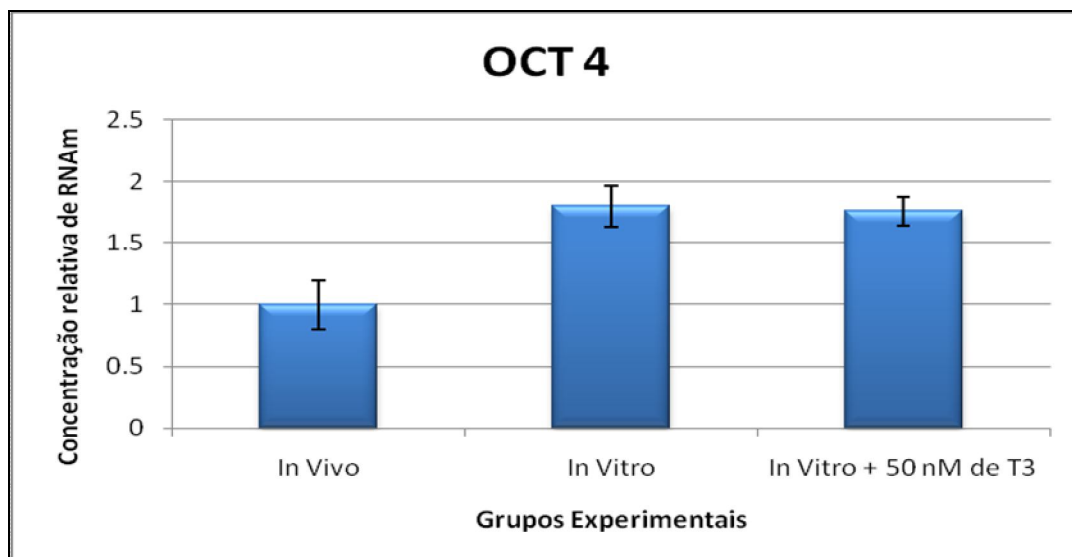


Figura 7: Concentração relativa dos transcritos do gene OCT 4 (média \pm erro padrão) dos embriões produzidos *In Vivo*, *In Vitro* (sem T3) e *In Vitro* com 50 nM de T3 ($p= 0,12$).

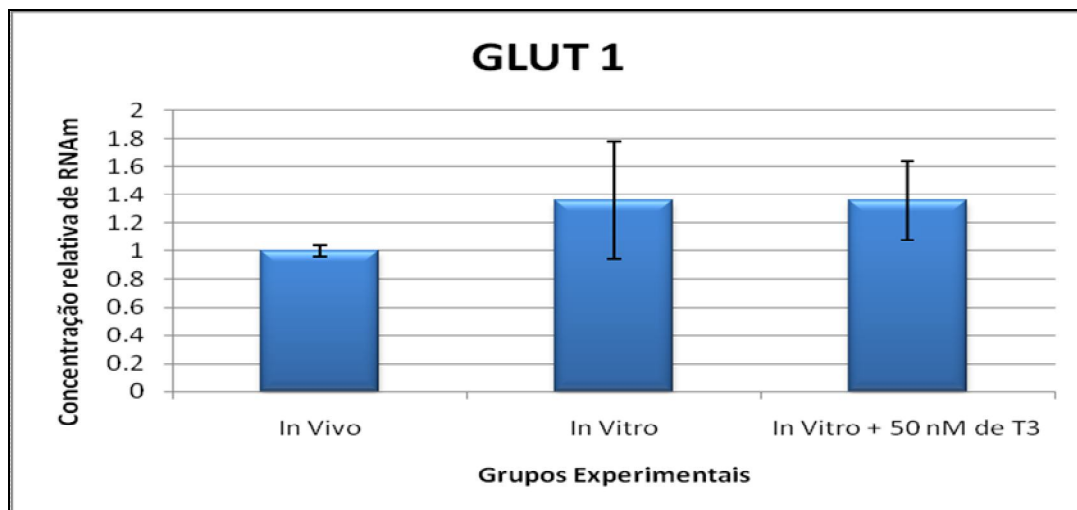


Figura 8: Concentração relativa dos transcritos do gene GLUT 1 (média ± erro padrão) dos embriões produzidos *In Vivo*, *In Vitro* (sem T3) e *In Vitro* com 50 nM de T3 ($p = 0.59$).

Embora a quantidade relativa de transcritos para o COX 43 tenha sido semelhante entre os Grupos Experimentais *In vivo*, *In vitro* sem T3, e *In Vitro* e com 50 nM de T3 ($1 \pm 0,22$; $2,66 \pm 0,88$ e $0,64 \pm 0,14$, respectivamente; $p > 0,05$), há uma tendência ($p = 0,065$) para que este gene seja mais expresso nos embriões do Grupo *In vitro* (Figura 9).

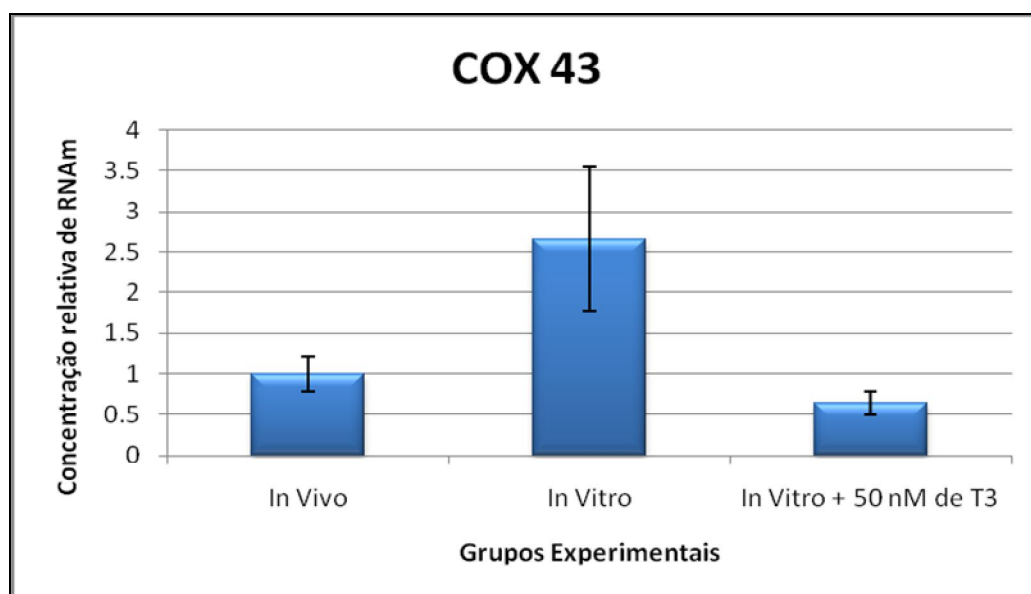


Figura 9: Concentração relativa dos transcritos do gene COX 43 (média ± erro padrão) dos embriões produzidos *In Vivo*, *In Vitro* (sem T3) e *In Vitro* com 50 nM de T3 ($p = 0,065$).

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que as concentrações de 25, 50 e 100 nM de triiodotironina quando adicionadas ao meio de maturação não exerceram influencia no potencial de desenvolvimento de embriões bovinos, corroborando com os achados de Ashkar et al. (2009), que não observaram diferença nas taxas de clivagem e blastocisto, porém o meio foi suplementado com 74 nM de triiodotironina e 74 nM de tiroxina.

Em nosso estudo a concentração de 5 nM de T3 apresentou redução na taxa de blastocisto. Essa influencia negativa do referido hormônio sobre o processo de maturação foi observado em camundongo por Cecconi et al. (2004) em cultivo de folículos pré-antrais por 4 dias, no qual a adição de T3 ao meio inibiu a quebra da vesícula germinativa.

Já em outros vertebrados, como em peixes sob condições de estresse térmico, o hormônio T3, colaborou na recuperação da competência oocitária *in vivo* e *in vitro*, repercutindo em taxas normais de fecundação e desenvolvimento embrionário (DETLAF & DAVYDOVA, 1974, MYLONAS et al., 1998).

O mecanismo de eclosão normalmente está relacionado a pressão mecânica exercida pelo embrião e atividade enzimática (GORDON, 1994; SUTOVSKY et al., 2001), neste experimento as maiores taxa de eclosão foram observadas nos grupos de 50 e 100, sugerindo a influencia do hormônio no metabolismo do complexo *cumulus*-oócito, e indiretamente melhorando o potencial de desenvolvimento do oócito e, conseqüentemente, de eclosão do embrião.

Vale ressaltar que apesar da suplementação com 100 nM de T3 ter aumentado a cinética de desenvolvimento, as taxas de embriões grau 1 foram inferiores neste grupo quando comparado ao Controle e ao grupo de 50 nM de T3.

A maturação oocitária em mamíferos é um processo complexo e bem organizado, que envolve a redistribuição de organelas e cromossomos. Em particular, a organização e a atividade mitocondrial assumem grande importância (STOJKOVIC et al., 2001), visto que essa organela é a principal responsável pela produção de energia e que o T3 possui ligantes na mitocôndria que estimulam a geração de ATP (GOGLIA et al., 1999, 2002; HARPER & SEIFET, 2008) Uma proposta interessante seria avaliar a influencia do hormônio tireoidiano sobre a atividade mitocondrial e a produção de ATP antes e após a maturação *in vitro*.

Sabe-se que apenas a análise morfológica do embrião não é suficiente para avaliar o sucesso de uma gestação, visto que sua competência pode estar comprometida, sem qualquer alteração evidente em suas características morfológicas (WRENZYCKI et al., 1996). Nesse sentido, apesar da concentração de 50 nM de T3 ter exercido influência apenas na taxa de eclosão, esperávamos encontrar diferenças na expressão de genes importantes no desenvolvimento embrionário. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que não há diferença nos níveis de expressão para nenhum dos transcritos avaliados entre os embriões *in vivo* e os oriundos de oócitos maturados sem e com T3.

Neste trabalho os embriões produzidos *in vitro* sem ou com T3 tiveram níveis de transcritos para OCT 4 próximos aos embriões *in vivo*. Resultados semelhantes foram relatados por Purpera et al. (2009). Entretanto, Camargo (2005) observou que embriões produzidos *in vivo* expressavam mais transcritos que os embriões provenientes de fecundação *in vitro* e transferência nuclear, sendo estes últimos

semelhantes na expressão de OCT4, sugerindo que a expressão desse gene seja fortemente influenciada principalmente pelo ambiente de cultivo *in vitro*.

WRENZYCKI et al. (1999) relataram que embriões *in vivo* apresentaram mais transcritos para GLUT 1 que embriões produzidos sob diferentes condições de cultivo *in vitro*. Resultados contrários foram observados por Purpera et al (2009) onde embriões *in vivo* tinham menos transcritos para GLUT 1 que os embriões produzidos *in vitro* sob baixa tensão de O₂ e 1 % de soro. Entretanto, de acordo com os nossos resultados não houve diferença entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* sem ou com T3. Devido aos diferentes resultados encontrados na literatura a expressão de GLUT1 deve ser mais investigada.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística na expressão do gene da COX 43, a quantidade de RNAm para este gene mostrou uma tendência em ser mais expresso (p= 0,06) nos embriões produzidos *in vitro* oriundos de oócitos maturados sem T3 quando comparado com os embriões do Grupo com 50 nM de T3 e os embriões *in vivo* entretanto, Rizos et al. (2002) detectaram mais transcritos desse gene em embriões *in vivo* do que os embriões *in vitro*.

Vale ressaltar que foi observada uma menor variação na expressão da COX 43 entre os conjuntos de embriões proveniente de oócitos maturados com 50 nM de T3, distribuição semelhantes a dos embriões *in vivo*.

Portanto, mais estudos são necessários a fim de entender o real efeito do T3 durante a maturação, através de uma melhor avaliação do complexo *cumulus*-oócito quanto ao metabolismo e transcrição de genes importantes no início do desenvolvimento embrionário, uma vez que o efeito desse hormônio foi analisado de forma indireta pela avaliação qualitativa do embrião.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a suplementação do meio de maturação com 50 nM de triiodotironina, estimulou a cinética do desenvolvimento embrionário (taxa de eclosão) e manteve inalterada a taxa relacionada a qualidade morfológica. Entretanto essa influencia parece não estar ligada a expressão dos transcritos para os genes estudados (OCT 4, GLUT 1 e a COX 43), observada em blastocistos no 8º dia de cultivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. **59**, p.539-549, 2003.

ASHKAR, F. A.; SEMPLE, E.; SCHMIDT, C. H.; JOHN, E.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development *in vitro*. **Human Reproduction**, p:1-11, 2009.

AYRES, M.; AYRES, M.Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BIOESTAT 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.; PUGLISIS, R. Gene expression in the *in vitro*-produce preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v.**15**, p: 355-367, 2007.

BETTS, D. H., MACPHEE, D.J., KIDDER, G.M., WATSON, A. Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase alpha- and beta-subunit isoform genes during bovine early development **J. Mol Reprod Dev**, v. **46**, p. 114-126, 1997.

BISWAS R.; BANDYOPADHYAY A.; GUIN S. and BHATTACHARYA S. Binding of thyroid hormone to mouse granulosa cell nuclei and its biological relevance. **J. Biosci.v. 18**,p: 327-335, 1993.

BLASZCZYK, B.; STANKIEWICZ, T.; UDALA, J.; GACZARZEWICZ, D.; LASOTA, B.;
BLASZCZYK, P.; SZYMANSKA, A.; SZYMANSKA-PASTERNAK, J. Free thyroid
hormones and cholesterol in follicular fluid of bovine ovaries. **Bull Veterinae
Institute Pulawy, v.50**, p.189-193, 2006.

BLOCK, J. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of
bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology, v. 68**, p. 49–55, 2007

CAMARGO, L. S .A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.;
VALE, V. R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal
Reproduction, v: 3**, p: 19-28, 2006.

CAMARGO, S. A. C. Produção *in vitro* e expressão gênica em embriões bovinos.
Tese de Doutorado. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, p.
30, 2005.

CECCONI, S.; ROSSI, G.; COTICCHIO, G.; MACCHIARELLI, G.; BORINI, A.;
CANIPARI, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle
development in vitro. **Fertility and Sterility, v. 81**, p. 919-924, 2004.

CHOKSI, N. Y. JAHNKE, G. D., HILAIRE, C. S., SHELBY, M. Role of Thyroid
hormones in human and laboratory animal reproductive health. **Birth Defects
Research, v. 68**, p. 479-491, 2003.

CORREA, G. A, RUMPF, R., MUNDIMA, T. C. D., FRANCO, M. M., DODEB, M. A. N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, 2007.

DAVIS P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. **29**, 211–218, 2008.

DETLAF, T.A.; DAVYDOVA,S.I. The effect of triiodothyronine on oocyte maturation in the starred sturgeon following exposure to low temperatures and female reservation. **Ontogenez**, v: **5**, p: 454-62, 1974.

DONG, Y.J.; VARISANGA, M.D.; MTANGO, N.R.; AONO, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO2 incubator. **Reproduction Dom Animal**, v: **36**, p: 313-318, 2001.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* versus *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v: **54**, p: 659-673, 2000.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy Embryology*, v. 4, p: 327-36, 1997.

FISCHER, B. & BAVISTER, B. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v: **99**, p: 673-679, 1993.

FLEMING, W. N. & SAACKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v: **2**, p. 203-213,1972.

GEREBEN, B.; ZAVACKI, A. M.; RIBICH, S.; KIM, B. W.; HUANG, S.A.; SIMONIDES, W.S.; ZEÖLD, A.; BIANCO, A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. **Endocr Rev**, v. **29**, p: 898-938, 2008.

GILCHRIST, R. B. Interações oócito-células do cúmulos regulando a qualidade do oócito. **Acta Scientiae Veterinarinae**, v. **36**, p. 257-278, 2008.

GOGLIA, F.; MORENO, M.; LANNI, A. Action of thyroid hormones at the cellular level: The mitochondrial target. **FEBS Lett** , p:115–120, 1999.

GOGLIA, F.; SILVESTRI, E.; LANNI, A. Thyroid hormones and mitochondria. **Biosci Rep**, v.**22**, p: 17–32, 2002.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M. AND COSTA, L.F.S.: Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1ª ed., São Paulo, p: 195-226, 2002.

GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S.H.; MINGOTI, G.Z. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reprod Domest Anim.** 2008.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** Cambridge: Cambridge University Press, p:1; 285, 1994.

GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R. **Textbook of Endocrine Physiology,** 3^a ed. OXFORD: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1996.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIÉ, Y.: Effects of growth factors EGF e IGF-I e estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology,** 54: 209-218, 2000.

GUYTON & HALL. **Tratado De Fisiologia Médica.** 11^o ed, ELSEVIER, p. 304, 2006.

HAFEZ, E.S.E & HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7.ed. Barueri: Manole, p: 509, 2004.

HARPER, M. E. & SEIFERT, E. L. Thyroid Economy—Regulation, Cell Biology, Thyroid Hormone Metabolism and Action: The Special Edition: Metabolic Effects of Thyroid Hormones on Mitochondrial Energetics. **THYROID,** v: 18, p:145-156, 2008.

HARVEY, A. J.; KIND, M.; , D. T.; ARMSTRONG, J. T. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of reproduction**, v. **71**, p: 1108–1119, 2004.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v: **98**, p: 113–128, 2007.

HASHIMOTO, S.; NAO, J.M.; RYO, T.; HIROSHI, I. Bovine Immature Oocytes Acquire Developmental Competence During Meiotic Arrest In Vitro¹. **Biology of Reproduction**, v. **66**, p.1696–1701, 2002.

HENKEL, R. The impact of oxidants on sperm function. **Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd Andrologia**, v. **37**, p. 205–206, 2005.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; GREVE, T.; CALLESEN. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. **52**: 683-700, 1999.

HUSSEIN, T. M.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v: **118**, p: 5257-5268, 2005.

HUSSEIN, T. S.; JEREMY, G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. **296**, p: 514–521, 2006.

HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. **38**, p. 35-47, 1989.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v: **47**, p: 23-32, 1997.

JOHNSON, M.L.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P.; BILSKI, J.J.; GRAZUL-BILSKA, A.T. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. **Endocrine**, v. **18**, p. 261-70, 2002

KANEKO, J.J. Carbohydrate metabolism and its diseases. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4^a ed. San Diego: Academic Press Limited, p: 44, 1989.

KHURANA, N. & NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. **62**, p: 847-856, 2000.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v. **123**, p. 613–620, 2002.

KIRCHHOF,N., CARNWATH,J. W., LEMME, E., ANASTASSIADIS,K., SCHO" LER, H, NIEMANN, H. Expression Pattern of Oct-4 in Preimplantation Embryos of Different Species. **Biology Of Reproduction**, v. **63**, p. 1698–1705, 2000.

KRISHER, R.L. & BAVISTER. B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v: **49**, p. 103-114, 1998.

LEEW, A.M.W. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v: **62**, p: 914-925, 2006.

LEQUARRE, A. S.; GRISART, B.; MOREAU, B.; SCHUURBIERS, N.; MASSIP, A.; DESSY, F. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. **Mol Reprod Dev.** v. **2**, p. 216-26, 1997.

LIM, K. T., GOO, J., KYUNG, H. K. WON, W. L., HEE, J. P., JUNG, J. K., SO, H. L., WOO, S. H., BYEONG, C.L., SUNG, K. K. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v: **67**, p: 293–302, 2007.

LONERGAN, H., KHATIR, C., CAROLAN, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24.. **Mermillod journal of reproduction and fertility**, v. **109**, p. 355-365, 1997.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIE´RREZ, A., MOREIRA, P.M., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, v. **69**, p.1424–1431, 2003.

LONERGAN, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos- Lidando com problemas. **Acta Scientific Veterinariae**, v. **36** p.349-360, 2008;

LUISIER, G.L.; URNER, F.; SAKKAS, D. Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development. **Hum Reprod**. v. **16**, p.1229-1236,1998.

MATOS, D.G. AND FUNUS, C.C.: The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, **53**: 761-771, 2000.

MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**, 3^a ed. Lea Febiger, Philadelphia. p: 560, 1980.

MEIRELLES, F.V.; CAETA.NO, A.R.; OWATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v: **82-83**, p: 13-20, 2004.

MILLER, G.F.; GLIEDT, D.W.; RAKES, J.M.; RORIE, R.W. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. **Theriogenology v: 41**, p: 689-696, 1994;

MOELLER, L.C.; CAO, X.; DUMITRESCU, A.M.; SEO, H.; REFETOFF, S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Nuclear Receptor Signaling, v.4**, p.1-4, 2006.

MYLONAS, C.C.; WOODS, L.C.; THOMAS, P.; ZOHAR, Y. Endocrine Profiles of Female Striped Bass (*Morone saxatilis*) in Captivity, during Postvitellogenesis and Induction of Final Oocyte Maturation via Controlled-Release GnRH α -Delivery Systems. **General and Comparative Endocrinology, v: 110**, p: 276–289, 1998.

NIEMAN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology, v: 53**, p: 21-34, 2000.

O'FLAHERTY, C.M.; RODRIGUEZ, P.; SRIVASTAVA, S. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta, v: 1674**, p: 215-221, 2004.

PALMIERI, S. L.; PETER, W.; HESS, HEIKE; SCHOLER, H.R. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in Implantation. **Development Biology**, v. **166**, p. 259-267, 1994.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; WINER, W. A. & FIRST, N. L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. **Biology Reproduction**, v. **38**, p: 1171-1180, 1988.

POPPE, K, VELKENIERS, B, GLINOER, D. Thyroid disease and female reproduction. **Clinical Endocrinology**, v. **66**, p: 309–321, 2007.

PURPERA, M. N.; GIRALDO, A. M.; BALLARD, C.B.; HYLAN, D.; GODKE, R.A.; BONDIOLI, K.R. Effects of Culture Medium and Protein Supplementation on mRNA Expression of In Vitro Produced Bovine Embryos. **Molecular Reproduction & Development**, v: **76**, p: 783–793, 2009.

RADANY, E.W.; ATHERTON, R.W. Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility. **Arch Androl**, v. **7**, p.351-355. 1981

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v: **37**, p: 75–93, 1992.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Analysis of differential messenger RNA expression between

- bovine blastocysts produced in different culture Systems: Implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction v.66**, p. 589-596, 2002.
- ROBERT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; PRAVETONI, M.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. **Biology of reproduction, v. 67**, p.1465–1472, 2002.
- SAELIM, N., HOLSTEIN, D., CHOCRON, E. S., CAMACHO, P., LECHLEITER, J. D. Inhibition of apoptotic potency by ligand stimulation thyroid hormone receptors located in mitochondrias _ apoptosis. **Apoptosis, v. 12**, p. 1781-1794, 2007.
- SECHMAN, A.; PAWLOWSKA, K.; RZASA, J.; Influence of triiodothyronine (T3) on secretion of steroids and thyroid hormone receptor expression in chicken ovarian follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, 2009.
- SPICER, L.J.; ALONSO, J.; CHAMBERLAIN, C.S. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function *in vitro*: Dependence on insulin and gonadotropins. **Journal Dairy Science, v. 84**, p. 1069-1076, 2001.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3^a ed. Guanabara: Koogan, 2002.

SRIVASTAVA, S.; DESAI, P.; COUTINHO, E.; GOVIL, G. Mechanism of Action of L-arginine on the Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. **Biology of Reproduction v:74**, p: 954–958, 2006.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. M.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction, v: 64**, p: 904–909, 2001.

SUTOVKY, P.; MOTLIK, J.; NEUBER, E.; PAVLOK, A.; SCHATTEN, G.; PALECEK, J.; HYTTEL, P.; ADEBAYO, O.T.; ADWAN, K.; ALBERIO, R et al. Accumulation of the proteolytic marker peptide ubiquitin in the trophoblast of mammalian blastocysts. **Cloning Stem Cells, v: 3**, p: 157–161, 2001.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update, v:9**, No.1 pp. 35-48, 2003.

TAKAHASHI, M; NAGAI, N.; OKAMURA, TAKAHASHI, H. Promoting Effect of b-Mercaptoethanol on In Vitro Development under Oxidative Stress and Cystine Uptake of Bovine Embryos. **Biology of Reproduction, v: 6**, p: 562–567, 2002.

TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E.. Successful culture in vitro of the sheep and cattle ova. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v: **30**, p: 493-497, 1972.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal Reproduction Fertility**, v: **106**, p:299–306, 1996.

THOMSON, J.G. Comparison between *in vivo* derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction Fertility Development**, v: **9**, p: 341-354, 1997.

VAN EIJK, M.J.T; VAN ROOIJEN, M.A.; MODINA, S.; SCESI, L.G. FOLKERS, G. VAN TOL, HT.A.; BEVERS, M.M.; FISHER, S.R.; GALLI, C.; DE VAUREIX, C., TROUNSON, A. O.; MUMMERY, C. L.; GANDOLFI, F. Molecular Cloning, Genetic Mapping, and Developmental Expression of Bovine POU5F11. **Biology Of Reproduction**, v: **60**, p. 1093–1103, 1999.

VAN SOON, A.; MATEUSEN, B. L. J.; KRUIF, A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? **Reproduction Biomedical Online**. v: **7**, p: 664-70, 2003.

VIANA, J. H. M. & CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae veterinariae**, v: **35**, p: 915-924, 2007.

VIANA, J. R. M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil.

O Embrião. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embrião. Ed. 42, p. 5-7, 2009;

ZHANG S.; CARRILLO J., A & DARLING, S.D. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells.

Molecular Human Reproduction, v. 3,. 555–562, 1997.

WAKIM, N.G.; RAMANI, N & RAO CV. Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells. **Am J Obstet Gynecol v. 156**, p: 237-40, 1987.

WAKIM, A. N., POLIZOTTO, S. L.; BUFFO, M. J.; MARRERO, M. A.; BURHOLT, D.

R. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. **Fertil Steril v. 6**, p: 1187-90,1993.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMAN, H. Expression of the

Gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v: 108, p: 17-24, 1996.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMAN, H. Expression of

RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p: 387-398, 1998.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H. Alterations in

the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos

cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol Reprod Dev**, v. **53**, p. 8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; KESKINTEPE, L; BRACKET, B.; NIEMANN, H.
Effects of culture systems and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation on bovine embryo. **Human Reproduction**, v: **16**, p: 893-901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger rna expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Biology of reproduction**, v. **68**, p.2073–2080, 2003.

WRENZYCKI, C, HERRMANN, D., NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. **68**, p. 77–83, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)